猪胰高血糖素样肽-2通过细胞外信号调节激酶1/2调节仔猪空肠上皮细胞紧密连接蛋白表达

齐珂珂　孙雨晴　万　晶　邓　波　门小明　吴　杰　徐子伟*

（浙江省农业科学院畜牧兽医研究所，杭州 310021）

摘　要：本试验以体外培养的仔猪空肠上皮细胞（porcine small intestinal epithelial cell from jejunum,IPEC-J2）为研究对象，研究了猪胰高血糖素样肽-2（porcine glucagon-like peptide-2,pGLP-2）对紧密连接蛋白表达的调节及其信号传导机制。培养液中分别添加 10^{-9} mol/L pGLP-2（pGLP-2 组）和 10^{-9} mol/L pGLP-2、10 μmol/L U0126（pGLP-2+U0126 组），对照组不添加以上试剂，每组 3 个重复，每个重复 1 个培养孔。测定 IPEC-J2 胞质紧密黏连蛋白-1（zonula occludens-1,ZO-1）、occludin、claudin-1 以及细胞外信号调节激酶 1/2（extracellular regulated kinase1/2,ERK1/2）蛋白表达量。结果表明：与对照组相比，IPEC-J2 细胞培养液中添加 pGLP-2 显著增加了 ZO-1、occludin、claudin-1 以及 p42-ERK1/2、p44-ERK1/2 的蛋白表达量（$P<0.05$）；与 pGLP-2 组相比，在 IPEC-J2 细胞培养液中加入 ERK1/2 的抑制剂 U0126，显著降低了 ZO-1、occludin、claudin-1 以及 p42-ERK1/2、p44-ERK1/2 的蛋白表达量（$P<0.05$）。综合得出，ERK1/2 通路是 pGLP-2 调控肠道上皮细胞紧密连接蛋白表达的一条重要信号通路。

关键词：猪胰高血糖素样肽-2；细胞外信号调节激酶 1/2；紧密连接蛋白

中图分类号：S828

胰高血糖素样肽-2（glucagon-like peptide-2,GLP-2）能够特异性地促进肠黏膜生长与损伤后修复，且作用强于以往发现的其他非特异的肠生长因子，为治疗各种因素引起的仔猪肠道损伤和功能紊乱提供了可能[1]。猪胰高血糖素样肽-2（porcine glucagon-like peptide-2,pGLP-2）通过 C 端延长，含有 35 个氨基酸，与人胰高血糖素样肽-2（human glucagon-like peptide-2,hGLP-2）具有相似的肠道促生长作用，pGLP-2 在体内的半衰期非常

收稿日期：2016-06-01

基金项目：现代农业产业技术体系（CARS-36）；浙江省自然科学基金项目（LY15C170002）

作者简介：齐珂珂（1981-），女，河南偃师人，助理研究员，博士，主要从事畜禽健康养殖研究。E-mail: nkyqkk@163.com

*通信作者，徐子伟，研究员，博士生导师，E-mail: zjsnkyxzw@163.com

短，极易被血液中大量存在的二肽酰肽酶-Ⅳ（dipeptidyl peptidase-Ⅳ,DPP-Ⅳ）快速降解[2]。GLP-2 通过作用于 GLP-2 受体（GLP-2 receptor,GLP-2R）来调节肠上皮细胞的增殖及抑制其凋亡，从而保护肠道细胞[3-4]。GLP-2 促进细胞增殖、抑制细胞凋亡以及细胞保护等作用的调节涉及多种细胞信号传导途径，主要有环化-磷酸腺苷/蛋白激酶 A（cAMP/PKA）或磷脂酰肌醇-3 激酶/蛋白激酶 B（PI-3K/Akt）途径、无翅型 MMTV 整合位点/β-连环蛋白（Wnt/β-catenin）途径、细胞外信号调节激酶 1/2（extracellular regulated kinase1/2,ERK1/2）等信号通路，但是 GLP-2 作用的信号传导机制存在争议[5-8]。GLP-2 功能的多样性以及研究所用的细胞模型不同是研究结果存在差异的主要原因，目前研究 GLP-2 作用机制的体外模型主要有 Caco-2 细胞[5]、BHK 成纤维细胞[6]、Hela 细胞[7]和 HEK293 细胞[8]等。本试验使用仔猪空肠上皮细胞（porcine small intestinal epithelial cell from jejunum,IPEC-J2）作为研究对象，为研究外源 pGLP-2 在仔猪肠道损伤和功能紊乱中的应用提供了肠源的细胞模型。本试验在研究 pGLP-2 对紧密连接蛋白表达影响的基础上，通过添加 ERK1/2 信号传导通路中的抑制剂 U0126，研究 pGLP-2 调控紧密连接蛋白表达的信号通路。

1 材料与方法

1.1 试验材料

IPEC-J2 细胞系由中国农业大学动物科学院王军军博士惠赠。[Gly2]pGLP-2（肽序列 HGDGSFSDEMNTVLDNLATRDFINWLLHTKITDSL）由杭州中肽生化有限公司合成。主要试剂有：DMEM/F12（Gibco,C11330500BT）、胎牛血清（fetal bovine serum,FBS）（Gibco,10099133）、100× 胰岛素铁硒传递蛋白（insulin-transferrin-selenium,ITS）（Sigma,I3146）、青-链霉素（Gibco,15140122）、表皮生长因子（epidermal growth factor,EGF）（Sigma,E4127）、0.25%胰蛋白酶-乙二胺四乙酸（EDTA）（Gibco,25200056）、猪 ERK1/2 抗体（Cell Signaling,4376s），β 肌动蛋白（β-actin）抗体（Santa Cruz,Sc47778）、胞质紧密黏连蛋白-1（zonula occludens-1,ZO-1）抗体（Santa Cruz,Sc10804），occludin 抗体（Abcam,Ab312721），claudin-1 抗体（Abcam,Ab15099），U0126（Cell Signaling,9903），羊抗小鼠辣根过氧化物酶标记的免疫球蛋白 G（IgG-HRP）（Pierce,PA128568）。其他常规试剂及试剂盒购置于华东医药集团有限公司。

1.2 试验方法及分组

IPEC-J2 培养于 75 cm^2 的细胞培养瓶中，37 ℃ 5% CO_2 95%湿度，使用完全培养基（93% DMEM/F12，5% FBS，1%ITS，1%青-链霉素，10 ng/mL EGF）进行培养，隔天换液，待 80%细胞融合时用 0.25%的胰蛋白酶-EDTA 消化液，按 1×10^5 个/孔接种至 6 孔板。待 80%细胞汇合时，采用无血清培养基培养，试验采用单因子设计，共设 3 个处理（对照组、pGLP-2 组和 pGLP-2+U0126 组），每个处理 3 个重复，每个重复 1 个培养孔。对照组和 pGLP-2 组中加入含 0、10^{-9} mol/L 的 pGLP-2 的无血清培养液过夜，pGLP-2+U0126 组加入 10 μmol/L U0126 预处理 1 h 后，加入含 10^{-9} mol/L pGLP-2 的无血清培养液，24 h 后弃去培养液，用预热的磷酸盐缓冲液（PBS）洗涤 2 次，加 RIPA 裂解细胞。

1.3 Western blotting 检测

用总蛋白提取试剂盒提取样品中的总蛋白，采用二喹啉甲酸（BCA）定量试剂盒进行总蛋白定量。配制 10%分离胶和 5%浓缩胶，每孔 60 μg 总蛋白上样，每孔 10~15 μL，浓缩胶 60 V、分离胶 80 V 电泳 5 h 左右。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)胶在 Tris-甘氨酸转移缓冲液中平衡 30 min，在冷却条件下 100 V 恒压转膜 2 h。转膜结束后，醋酸纤维素（PVDF）膜放到含 5%脱脂奶粉的吐温-Tris-盐酸缓冲液（T-TBS）中室温封闭 1 h。猪 ERK1/2 抗体、ZO-1 抗体、occludin 抗体、claudin-1 抗体和 β-actin 抗体分别按 1:1 000、1:500、1:1 000、1:800 和 1:2 000 的比例溶于含 3%脱脂奶粉的 T-TBS 中，4 ℃孵育过夜，T-TBS 漂洗 5 min，重复 4 次。加入二抗（1:2 000），室温孵育 1 h，T-TBS 漂洗 5 min，重复 5 次。采用 SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate 试剂盒，按说明书操作，制备约 1 mL ECL 工作液，室温孵育转印膜 1 min，保鲜膜密封，暗盒中放上 X 光片曝光 5~10 min 后进行显影和定影。采用 Bandscan 5.0 软件分析条带的光密度值，每个条带重复 3 次，按以下公式对目的蛋白进行相对定量。

目的蛋白表达量=目的蛋白光密度值/β-actin 光密度值。

1.4 数据处理和统计分析

采用 SAS 6.12 软件对数据进行单因素方差分析及 Duncan 氏法多重比较，测定结果以“平均值±标准差”表示。

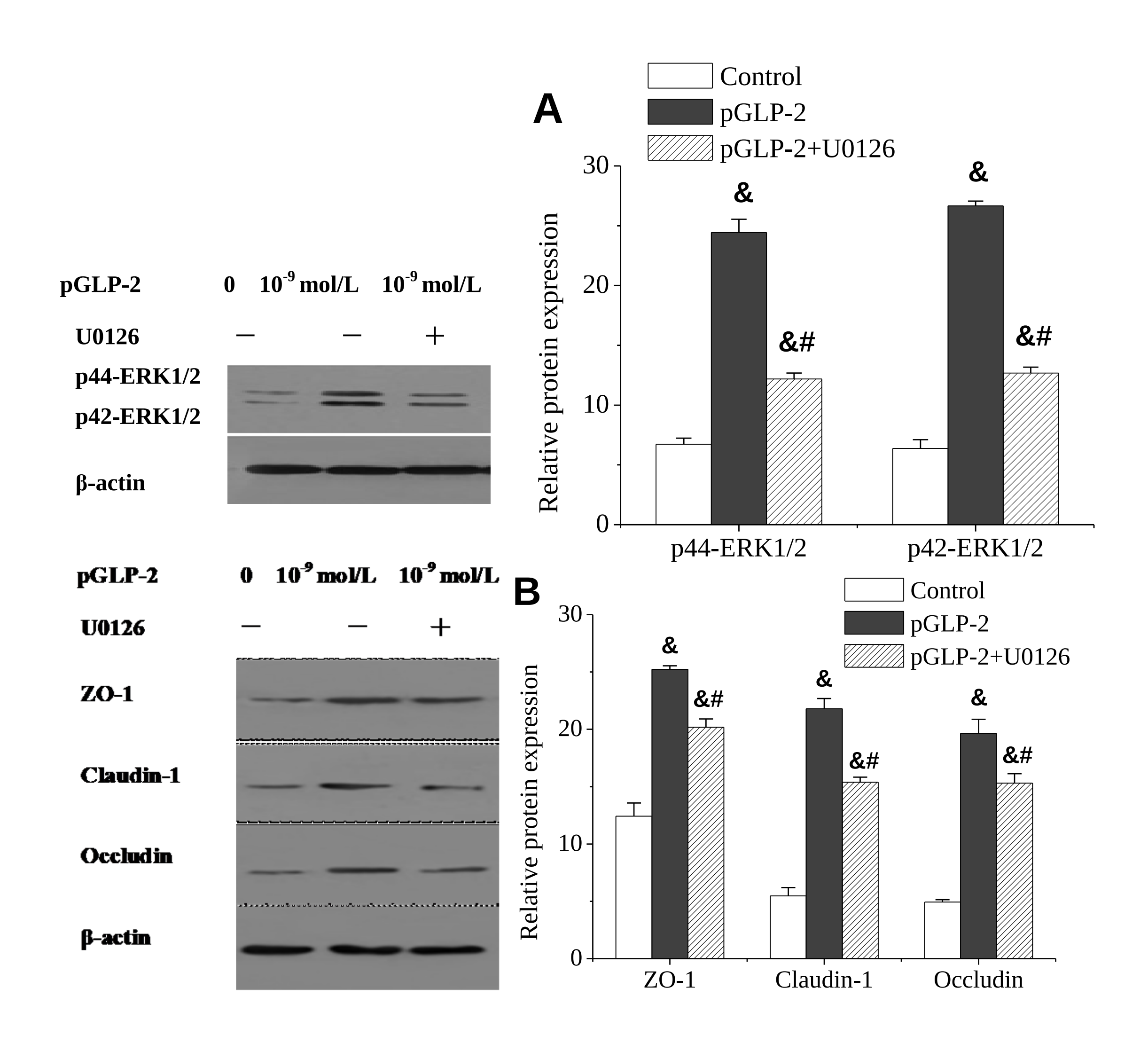
2 结 果

2.1 pGLP-2 对紧密连接蛋白及 ERK1/2 蛋白表达量的影响

由图 1 可见，与对照组相比，培养液中添加 pGLP-2 后，IPEC-J2 紧密连接蛋白 ZO-1、occludin、claudin-1 以及 p42-ERK1/2、p44-ERK1/2 的蛋白表达量显著增加（*P*<0.05）。

2.2 抑制剂 U0126 对紧密连接蛋白及 ERK1/2 蛋白表达量的影响

由图 1 可见，与 pGLP-2 组相比，在使用 ERK1/2 抑制剂 U0126 预处理后的 IPEC-J2 中添加 pGLP-2，紧密连接蛋白 ZO-1、occludin、claudin-1 以及 p42-ERK1/2、p44-ERK1/2 的蛋白表达量显著降低（*P*<0.05）。



&：与对照组相比差异显著（*P*<0.05）；#：与 pGLP-2 组相比差异显著（*P*<0.05）。

&: significant difference compared with control group (*P*<0.05); #: significant difference compared with pGLP-2 group (*P*<0.05).

图 1 pGLP-2 对 IPEC-J2 紧密连接蛋白和 ERK1/2 蛋白表达量的影响

Fig.1 Effects of pGLP-2 on protein expressions of ERK1/2 and tight junction proteins in IPEC-J2

3 讨 论

GLP-2 能够有效地促进肠上皮细胞紧密连接蛋白的表达，增强肠道屏障功能。Dong 等[9]报道 GLP-2 能够显著提高小鼠空肠紧连接关键蛋白 occludin、claudin-3、claudin-7 基因的表达量。Moran 等[10]研究发现，GLP-2 不仅能够显著增加 Caco-2 细胞紧密连接关键蛋白 occludin 和 ZO-1 的蛋白表达量，还能有效抑制由肿瘤坏死因子 α（TNF-α）应激造成的 occludin 和 ZO-1 的蛋白表达量的降低。Wu 等[11]证明一次注射[Gly2]pGLP-2 微球可有效抑制葡聚糖硫酸钠盐（DSS）引起的小鼠结肠 occludin 表达量的降低。以 IPEC-J2 为研究模型的研究表明，GLP-2 能够显著地改善正常培养条件下 IPEC-J2 细胞形态结构，提高紧密连接关键蛋白 occludin、claudin-1 和 *ZO*-1 基因的表达量[12]；GLP-2 还能有效的抑制脂多糖（LPS）应激造成的 IPEC-J2 细胞形态的破坏和紧密连接关键蛋白基因表达量的下降。与以上结果相一致，本试验发现 IPEC-J2 中添加 pGLP-2 后，紧密连接蛋白 ZO-1、occludin 和 claudin-1 的蛋白表达量显著增加。

在对紧密连接蛋白的调控研究中发现，众多生长因子能够通过丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase，MAPK）信号通路调控紧密连接蛋白的表达，实现对屏障功能的调节[13]。ERK1/2 信号通路是经典 MAPK 信号传导途径，GLP-2 可通过 ERK1/2 信号通路直接促进上皮细胞增殖。Jasleen 等[14]使用 10 nmol/L GLP-2 刺激人肠上皮细胞株 Caco-2，细胞内活化形式 ERK1/2 含量明显增加，细胞的增殖反应增加了 10 倍；细胞外调节蛋白激酶（MEK）抑制剂 PD98059 以剂量依赖性方式阻断 GLP-2 的促细胞增殖作用。随后 Jasleen 等[15]再次证明 GLP-2 促进 Caco-2 细胞增殖伴随着 ERK 磷酸化水平的瞬间升高，这种反应会被 MEK 抑制剂 PD98059 所阻断。但是 Yusta 等[16]则报道 20 nmol/L 的 GLP-2 没有增加乳仓鼠肾成纤维细胞（baby hamster kidney fibroblasts,BHK）ERK1/2 的磷酸化水平，反而降低了 ERK1/2 的基础磷酸化水平，认为 GLP-2 的信号传导不与 p44/p42 MAPK 途径相偶联，这可能与研究使用的细胞为肾源细胞有关。关于试验所用的细胞模型表达 GLP-2R 与否对 GLP-2R 的信号传导机制的影响，Koehler 等[7]在 Hela 细胞上的研究发现 GLP-2 介导 ERK1/2 的激活不会通过减少 GLP-2R cDNA 的转染而消除。Li 等[17]研究也证明，小鼠小胶质瘤 BV-2 细胞虽然不表达 GLP-2R，可是 GLP-2 减弱 LPS 引起的 BV-2 细胞炎性反应也是通过抑制

ERK1/2 信号通路实现的。也就是说，研究 GLP-2 调节肠道功能信号传导机制的细胞模型不同，是引起此方面研究结果存在争议的主要原因。U0126 是 MAPK 激酶 MEK1/2 的高效选择性抑制剂，比 PD98059 的抑制活性高 100 倍。以非竞争性方式抑制 MEK1/2 激酶的活性从而阻止分别由 *ERK*2 和 *ERK*1 基因编码的 p42 MAPK 和 p44 MAPK 被激活。本试验中添加 U0126 后，p42-ERK1/2、p44-ERK1/2 的蛋白表达量显著降低，且研究使用的 IPEC-J2 细胞系是正常生理状态下的新生仔猪空肠上皮细胞系，是最理想的研究猪源的 GLP-2 调节肠道屏障功能的细胞模型。本试验结果表明，使用 10^{-9} mol/L 的 pGLP-2 处理 IPEC-J2，可显著增加紧密连接蛋白 ZO-1、occludin、claudin-1 以及 p42-ERK1/2、p44-ERK1/2 的蛋白表达量，而用 ERK1/2 抑制剂 U0126 预处理后再添加 pGLP-2，显著抑制紧密连接蛋白 ZO-1、occludin、claudin-1 以及 p42-ERK1/2、p44-ERK1/2 的蛋白表达量，说明 ERK1/2 通路是 pGLP-2 调控肠道上皮细胞紧密连接蛋白表达的一条重要信号通路。

4 结 论

ERK1/2 抑制剂 U0126 能显著抑制 pGLP-2 引起的 ZO-1、occludin、claudin-1 以及 p42-ERK1/2、p44-ERK1/2 蛋白表达量的增加，说明 ERK1/2 是 pGLP-2 调控肠道上皮细胞紧密连接蛋白表达的一条重要信号通路。

参考文献：

[1] BURRIN D G,STOLL B,GUAN X.Glucagon-like peptide 2 function in domestic animals[J].Domestic Animal Endocrinology,2003,24(2):103–122.

[2] PEDERSEN N B,HJOLLUND K R,JOHNSEN A H,et al.Porcine glucagon-like peptide-2:structure,signaling,metabolism and effects[J].Regulatory Peptides,2008,146(1/2/3):310–320.

[3] DRUCKER D J,DEFOREST L,BRUBAKER P L.Intestinal response to growth factors administered alone or in combination with human[Gly^2]glucagon-like peptide 2[J].American Journal of Physiology,1997,273(6):G1252–G1262.

[4] HSIEH J,LONGUET C,MAIDA A,et al.Glucagon-like peptide-2 increases intestinal lipid absorption and chylomicron production via CD36[J].Gastroenterology,2009,137(3):997–1005.

[5] 赵云.胰高血糖素样多肽-2的重组表达及其对肠道保护作用机制的实验研究[D].博士学位论文.重庆:第三军医大学,2006.

[6] YUSTA B,ESTALL J,DRUCKER D J.Glucagon-like peptide-2 receptor activation engages bad and glycogen synthase kinase-3 in a protein kinase A-dependent manner and prevents apoptosis following inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase[J].Journal of Biological Chemistry,2002,277(28):24896–248906.

[7] KOEHLER J A,YUSTA B,DTUCKER D J.The Hela cell glucagon-like peptide-2 receptor is coupled to regulation of apoptosis and ERK1/2 activation through divergent signaling pathways[J].Molecular Endocrinology,2005,19(2):459–473.

[8] SHI X M,LI X J,WANG Y,et al.Glucagon-like peptide-2-stimulated protein synthesis through the PI 3-kinase-dependent Akt-mTOR signaling pathway[J].American Journal of Physiology,2011,300(3):E554–E563.

[9] DONG C X,ZHAO W,SOLOMON C,et al.The intestinal epithelial insulin-like growth factor-1 receptor links glucagon-like peptide-2 action to gut barrier function[J].Endocrinology,2014,155(2):370–379.

[10] MORAN G W,O'NEILL C,MCLAUGHLIN J T.GLP-2 enhances barrier formation and attenuates TNFα-induced changes in a Caco-2 cell model of the intestinal barrier[J].Regulatory Peptides,2012,178(1/2/3):95–101.

[11] WU J,QI K K,XU Z W,et al.Glucagon-like peptide-2-loaded microspheres as treatment for ulcerative colitis in the murine model[J].Journal of Microencapsulation,2015,32(6):598–607.

[12] 余长松,贾刚,邓秋红,等.胰高血糖素样肽-2 对脂多糖应激的 IPEC-J2 细胞形态和紧密连接相关基因表达的影响[J].畜牧兽医学报,2015,46(4):592–599.

[13] GONZÁLEZ-MARISCAL L,TAPIA R,CHAMORRO D.Crosstalk of tight junction components with signaling pathways[J].Biochimica et Biophysica Acta,2008,1778(3):729–756.

[14] JASLEEN J,SHIMODA N,SHEN E R,et al.Signaling mechanisms of glucagon-like peptide 2-induced intestinal epithelial cell proliferation[J].Journal of Surgical

Research,2000,90(1):13–18.
[15] JASLEEN J,ASHLEY S W,SHIMODA N,et al.Glucagon-like peptide 2 stimulates intestinal epithelial proliferation in vitro[J].Digestive Diseases and Sciences,2002,47(5):1135–1140.
[16] YUSTA B,SOMWAR R,WANG F,et al.Identification of glucagon-like peptide-2 (GLP-2)-activated signaling pathways in baby hamster kidney fibroblasts expressing the rat GLP-2 receptor[J].The Journal of Biological Chemistry,1999,274(43):30459–30467.
[17] LI N,LIU B W,REN W Z,et al.GLP-2 attenuates LPS-induced inflammation in BV-2 cells by inhibiting ERK1/2,JNK1/2 and NF-κB signaling pathways[J].International Journal of Molecular Sciences,2016,17(2):190.

Porcine Glucagon-like Peptide-2 Regulates Tight Junction Protein Expressions in Porcine Small Intestinal Epithelial Cell through Extracellular Regulated Kinase 1/2 Signaling Pathway

QI Keke　SUN Yuqing　WAN Jin　DENG Bo　MEN Xiaoming　WU Jie　XU Ziwei*
(*Institute of Animal Science, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou* 310021, *China*)

Abstract: Porcine small intestinal epithelial cell from jejunum (IPEC-J2) was used to study the regulation of porcine glucagon-like peptide-2 (pGLP-2) on protein expressions of tight junction and its signaling pathway. Culture mediums were supplemented without (control group) or with 10^{-9} mol/L pGLP-2 （pGLP-2 group）, and 10^{-9} mol/L pGLP-2 and 10 μmol/L U0126 （pGLP-2+U0126 group）， respectively. Each group had 3 replicates with 1 culture pore per replicate. Protein expressions of zonula occludens-1 (ZO-1), occluding, claudin-1 and extracellular regulated kinase1/2 (ERK1/2) in cytoplasm of IPEC-J2 were determined. The results showed as follows: compared with control group, the supplementation of pGLP-2 in culture medium of IPEC-J2 significantly increased protein expressions of ZO-1, claudin-1, occludin, p42-ERK1/2 and p44-ERK1/2 ($P<0.05$); compared with pGLP-2 group, the supplementation of U0126, an inhibitor of ERK1/2, in culture medium of IPEC-J2 significantly decreased protein expressions of the above proteins ($P<0.05$). The results suggest that ERK1/2 pathway is an important signaling pathway of pGLP-2 regulating tight junction protein expressions in intestinal

epithelial cells.

Key words: porcine glucagon-like peptide-2; extracellular regulated kinase1/2; tight junction protein

---

*Corresponding author, professor, E-mail: zjsnkyxzw@163.com

（责任编辑　王智航）